

POLYTYPIC ANALYSIS

Patent number: JP10084999
Publication date: 1998-04-07
Inventor: HAGIWARA HISASHI; USUI SANPEI; SAKURAI TOSHIYUKI
Applicant: HITACHI ELECTR ENG
Classification:
- **international:** C12Q1/68; C07H21/04; C12N15/09; G01N21/64
- **european:**
Application number: JP19960269370 19960919
Priority number(s): JP19960269370 19960919

Abstract of JP10084999

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a polytypic analysis method capable of analyzing plural kinds of specimens at the same time even by using a single fluorescent dye. **SOLUTION:** A mixture of two kinds of primers and a DNA specimen is amplified by PCR method, the fluorescent-labeled amplified product is introduced to a migration lane of a gel electrophoresis plate of a fluorescent sequencer and migrated in a gel electrolyte by electrophoresis, the migrated fluorescent- labeled amplified product is irradiated with excitation light, the fluorescent light generated from the product is measured to form a ladder pattern of the nucleic acid specimen to be determined and the pattern is compared with a standard ladder pattern. In the above polytypic analysis method, a non- fluorescent labeled primer is added with bases of a number not smaller than one add not larger than the number obtained by subtracting one from the number of the bases constituting the polytypic region, a PCR-amplification product is formed by using the base-added primer and the product is subjected to electrophoresis together with a PCR amplification product obtained from the original primer free from added base to enable the simultaneous analysis of two or more kinds of specimens.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-84999

(43)公開日 平成10年(1998) 4月7日

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

A

C 0 7 H 21/04

C 0 7 H 21/04

B

C 1 2 N 15/09

Z N A

G 0 1 N 21/64

Z

G 0 1 N 21/64

C 1 2 N 15/00

Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数 2 F D (全 6 頁)

(21)出願番号

特願平8-269370

(22)出願日

平成8年(1996) 9月19日

(71)出願人 000233480

日立電子エンジニアリング株式会社
東京都渋谷区東3丁目16番3号

(72)発明者 萩原 久

東京都渋谷区東3丁目16番3号 日立電子
エンジニアリング株式会社内

(72)発明者 白井 三平

東京都渋谷区東3丁目16番3号 日立電子
エンジニアリング株式会社内

(72)発明者 桜井 利之

東京都渋谷区東3丁目16番3号 日立電子
エンジニアリング株式会社内

(74)代理人 弁理士 梶山 信是 (外1名)

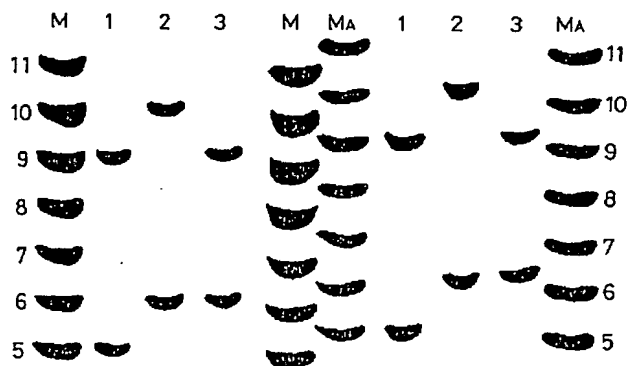
(54)【発明の名称】 多型解析方法

(57)【要約】

(修正有)

【課題】 単一の蛍光色素でも、同時に複数種類の検体を分析できる新規な多型解析方法の提供。

【解決手段】 2種類のプライマーとDNA検体との混合物をPCR法で増幅し、蛍光標識増幅生成物を蛍光シーケンサのゲル電気泳動板の泳動レーンに注入して電気泳動することによりゲル電解質層内を移動させ、移動してきた蛍光標識増幅生成物に励起光を照射し、この生成物から発生される蛍光を測定することにより被分析核酸検体のラダーパターンを生成し、これを基準ラダーパターンと比較する多型解析方法において、前記非蛍光標識プライマーに、1個以上、前記多型領域を構成する塩基の数から1を減じた数以下の塩基を付加し、この塩基付加プライマーを用いてPCR増幅生成物を生成し、これと共に、塩基の付加されていない元のプライマーから得られたPCR増幅生成物を電気泳動することにより2種類以上の検体を同時に分析する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 分析すべきDNA検体に特定の多型領域を挟み込むように設計された2種類のプライマーのうちの一方を単一の蛍光色素で標識し、この蛍光標識プライマーと非蛍光標識プライマーとDNA検体との混合物をPCR法で増幅し、この蛍光標識増幅生成物を蛍光シーケンサのゲル電気泳動板の泳動レーンに注入して電気泳動することによりゲル電解質層内を移動させ、移動してきた蛍光標識増幅生成物に励起光を照射し、この生成物から発生される蛍光を測定することにより被分析核酸検体のラダーパターンを生成し、このラダーパターンを同一の多型領域を有する基準となるアレリックラダーサイズマーカーの基準ラダーパターンと比較することにより被分析DNA検体の多型繰り返し数を検出することからなる多型解析方法において、

前記非蛍光標識プライマーに、1個以上、前記多型領域を構成する塩基の数から1を減じた数以下の塩基を付加し、この塩基付加プライマーを用いてPCR増幅生成物を生成し、

この塩基付加プライマーから得られたPCR増幅生成物と共に、塩基の付加されていない元のプライマーから得られたPCR増幅生成物を電気泳動することにより2種類以上の検体を同時に分析することを特徴とする多型解析方法。

【請求項2】 アレリックラダーサイズマーカーとして、[AATG]の4塩基の連なりからなるTH01の多型領域のものを使用し、プライマーに1～3個の塩基を付加することにより、同時に4種類の検体を分析する請求項1の多型解析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はDNAなどの核酸の断片長分析における多サンプル処理を可能とするフラグメント解析方法に関する。更に詳細には、本発明は蛍光式フラグメント分析装置において、DNAの断片長分析における同塩基対(bp)サイズ領域の複数分析を可能とする多型解析方法に関する。

【0002】

【従来の技術】DNAの機能解析から得られる情報は数知れない。例えば、特徴的な遺伝子の、アデニン

(A)、グアニン(G)、チミン(T)及びシトシン(C)からなる塩基配列を知ることによって、種の同定や、鑑定を行うことが可能となる。これらの機能解析は例えば、蛍光式シーケンサを使用して処理することができる。

【0003】動物でも植物でも、塩基配列中に特異的な塩基の連なりからなる繰り返しがあることが知られている。また、この繰り返しの数が個々の個体により異なっているものを“多型”と呼んでいる。この塩基の連なりが短い(2～5bp程度)ものをSTR(Short Tandem

Repeat)といい、この2～5bpの配列による種の同定や固体の識別を行う方法はSTR法と呼ばれる。

【0004】例えば、ヒトの個人識別にはTH01と呼ばれている[AATG]の4個の塩基の連なりからなる多型領域が用いられている。この場合、多型部分を含む領域を蛍光標識してPCR法で増幅し、電気泳動手段を備えた蛍光シーケンサで検出すると、多型領域の繰り返し数によりDNA断片の泳動速度(移動度)が異なり、幾つかのパターン分けを行うことができる。

【0005】ヒトの遺伝子は父親から1セット(22本の常染色体と性染色体1本)、母親から1セットを受けた2セット(44本の常染色体と性染色体2本)からなっている。例えば、[AATG]という塩基の繰り返し領域を、父が5回(すなわち、-AATGAATGAATGAATGAATG-)と9回(すなわち、-AATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATG-)、母が6回と10回の場合、その子供は5-6、5-10、9-6、9-10の4つのタイプの何れかの繰り返し領域を有することとなる。親子鑑定等にはこのような型の状態を確認すればよいこととなる。また、個体を識別する場合もこのような領域を複数箇所調べることで、その人であることの確からしさが増していく。

【0006】図2はTH01のアレリックラダーマーカーを用いて親子鑑別を行ったラダーパターンの一例である。TH01のアレリックラダーマーカー自体は公知であり、米国のプロメガ(Promega)社からジーンプリント(GenePrint)STRシステムズとして一般に市販されている。両親及び子供から採取した、基となるDNAにTH01の多型領域を挟み込むように設計された、蛍光色素で標識されたプライマーをPCR法により増幅し、蛍光標識増幅生成物を蛍光シーケンサのゲル電気泳動板の各泳動レーンに注入して電気泳動すると図2に示されるようなラダーパターンが得られる。Mは基準となるアレリックラダーマーカーであり、その左側の数字は多型の繰り返し数である。このラダーパターンから明らかなように、レーン1に注入された父親は5回と9回の繰り返し数を有し、レーン2に注入された母親は6回と10回の繰り返し数を有し、レーン3に注入された子供は9回と6回の繰り返し数を有する。従って、この結果から、この子供は両親と遺伝学的な親子関係を有することが確認される。

【0007】個体識別などの場合、識別の信頼性を確保するために、単一の多型領域だけでなく、他の多型領域についても同様な分析を行うことが必要である。例えば、TH01の多型領域と共にF13Bの多型領域を用いて個体識別を行うことがある。F13Bの多型領域は[AAT]からなる塩基の連なりを有する。しかし、TH01の多型領域を有するアレリックラダーのサイズは179～203bpであり、F13Bの多型領域を有

するアレリックラダーのサイズは169~189bpであり、TH01の多型領域の既知繰り返し数は5、6、7、8、9、9、3、10、11であり、F13Bの多型領域の既知繰り返し数は6、7、8、9、10、11である。従って、この2つの多型領域を使用して個体識別を行うと、得られたラダーパターンに重複部が生じてしまうことがある。

【0008】このため、従来の蛍光シーケンサによる多型分析では、各多型領域を有するプライマーを、異なる励起波長を有する別々の蛍光色素で標識していた。プライマーを標識する蛍光色素が異なるため、各プライマーから生じる蛍光の波長も異なる。従って、各蛍光波長に対応するデータに対し、例えば、緑色と赤色を指定しておき、得られたデータを緑色と赤色でCRTスクリーンに表示したり、カラープリンターで出力すれば、たとえDNA断片のbpサイズが同一のために、ラダーパターンが重複しても、各ラダーパターンがどの多型領域に帰属するか明確に区別することができる。

【0009】しかし、このような複数の蛍光色素を使用する場合、分析に使用される蛍光シーケンサ自体が、使用される蛍光色素の数に対応する個数の励起光源又は複数の励起波長を分別するための複数のバンドパスフィルタを備えていなければならない。励起光源やバンドパスフィルタを複数個配設すると、蛍光シーケンサの光源系及び受光系の構造が複雑化し、装置全体が大型化するばかりか、シーケンサのコストが大幅に上昇し好ましくない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、単一の蛍光色素でも、同時に複数種類の検体を分析することができる新規な多型解析方法を提供することである。

【0011】

【課題を解決するための手段】前記課題は、分析すべきDNA検体に特定の多型領域を挟み込むように設計された2種類のプライマーのうち的一方を単一の蛍光色素で標識し、この蛍光標識プライマーと非蛍光標識プライマーとDNA検体との混合物をPCR法で増幅し、この蛍光標識増幅生成物を蛍光シーケンサのゲル電気泳動板の泳動レーンに注入して電気泳動することによりゲル電解質層内を移動させ、移動してきた蛍光標識増幅生成物に励起光を照射し、この生成物から発生される蛍光を測定することにより被分析核酸検体のラダーパターンを生成し、このラダーパターンを同一の多型領域を有する基準となるアレリックラダーサイズマーカーの基準ラダーパターンと比較することにより被分析DNA検体の多型繰り返し数を検出することからなる多型解析方法において、前記非蛍光標識プライマーに、1個以上、前記多型領域を構成する塩基の数から1を減じた数以下の塩基を付加し、この塩基付加プライマーを用いてPCR増幅生

成物を生成し、この塩基付加プライマーから得られたPCR増幅生成物と共に、塩基の付加されていない元のプライマーから得られたPCR増幅生成物を電気泳動することにより2種類以上の検体を同時に分析することの特徴とする多型解析方法により解決される。

【0012】

【発明の実施の形態】基準となるアレリックラダーサイズマーカーとして、例えば、TH01の多型領域のものを使用する場合、この多型領域は[AA TG]の4塩基からなるので、本発明によれば、PCR法で使用するプライマーに塩基を1個、2個又は3個付加することができる。これにより、塩基が付加されていない元のプライマーを含めて4種類のプライマーが使用できるので、同時に4検体の分析が可能となる。

【0013】本発明の多型解析方法で使用するのに必要なPCR増幅生成物を生成するためのPCR法自体は当業者に公知である。図3はこのPCR法の原理を説明する模式的工程図である。まず、ステップ1で、分析すべき目的のDNA検体を準備する。DNA検体はヒトの髪の毛、ツメ、皮膚、血液、リンパ球など任意のものを使用できる。次いで、ステップ2で、この目的のDNA検体の2本鎖にそれぞれ適当な2種類のプライマー（例えば、20mer程度のオリゴヌクレオチド）を選び、これらを混合し、熱変性及びアニーリング処理してDNA合成を行わせる。熱変性・アニーリング処理により合成されたDNAをTaqポリメラーゼ反応により一本鎖にする（ステップ3）。その後、温度を変化させるだけで、熱変性・アニーリング・Taqポリメラーゼ反応が進行する（ステップ4）。このステップをn回繰り返す。理論的に、1ステップ毎にDNAは2倍に合成される。従って、n回のステップ終了後には、分析すべきDNAは2ⁿ倍に増幅され、増幅生成物が得られる（ステップ5）。

【0014】本発明の多型解析方法で使用するのに必要なPCR増幅生成物を生成するためのプライマーは各多型領域に適したものが、米国のプロメガ(Promega)社からジーンプリント(GenePrint)STRシステムズとして一般に市販されている。従って、実際の分析では、プロメガ社から各多型領域に適したプライマー合成キットを購入し、この合成キットに分析すべきDNA検体を混合してPCR法を実行すれば、目的とするDNA増幅生成物を容易に得ることができる。

【0015】プライマーのサイズを変更するために、プライマーに1~3個の塩基を付加することは、市販のDNA合成器を使用することにより容易に実施できる。このようなDNA合成器としては、例えば、米国のミリポア(Millipore)社のサイクロン(CYCLON)（登録商標）プラスDNA/RNAシンセサイザーなどを使用できる。塩基の付加はプライマー1又は2のうちの何れか一方又は両方に対して実施できる。しかし、経済的な観点から

プライマー1だけに塩基を付加することが好ましい。プライマー2は蛍光標識の付加に使用されるからである。プライマー2へ塩基を付加し、プライマー1へ蛍光色素を付加することも当然できる。付加される塩基は特に限定されないが、DNA構成塩基と同じA、T、C、Gのうちから選択することが好ましい。また、この塩基の付加により既知の多型と同じ塩基配列が構成されないようにすることが好ましい。

【0016】プライマー2への蛍光色素の付加は市販のDNA合成器を使用することにより容易に実施できる。このようなDNA合成器としては、前記のサイクロン(CYCLON)プラスDNA/RNAシンセサイザーなどを使用できる。例えば、DNA合成器でプライマー2を合成する際、まず、プライマー2の末端部(すなわち、5'側又は5'末端)にアミノ基を付加し、その部位に蛍光色素を化学結合させる。プライマー2の5'末端へのアミノ基の付加もDNA合成器で行うことができる。本発明の方法で使用できる蛍光色素は特に限定されない。蛍光色素を励起するのにレーザ光を使用する場合、そのレーザ光の励起波長と、蛍光色素の発光波長との組み合わせを考慮して決定することができる。本発明で使用できる蛍光色素は例えば、イソチオシアン酸フルオレセイン(FITC)、イソチオシアン酸エオシン(EITC)、イソチオシアン酸テトラメチルローダミン(TMRICT)、置換イソチオシアン酸ローダミン(XRICT)、スルホローダミン101酸クロリド(“テキサスレッド”の商標名で市販されている)などである。励起光源として波長が594nmのHe-Neレーザを使用する場合、蛍光色素は励起極大波長が596nm、発光極大波長が615nmのテキサスレッドを使用することが好ましい。また、波長が488nmのアルゴンイオンレーザを使用する場合、蛍光色素はFITCを使用することが好ましい。プライマーとDNA鎖(PCR産物)のハイブリッド化を妨げたり、ポリメラーゼによる3'末端方向への伸長反応を妨げなければ、化学発光試薬などを使用することも可能である。

【0017】また、各多型領域を有する基準となるアレリックラダーサイズマーカーはPCR増幅生成物として、前記プライマー合成キットと共に販売される。従って、マーカー自体はPCR法により増幅生成処理する必要はない。しかし、塩基を付加したプライマーを使用する場合、この塩基付加プライマーから生成されたPCR増幅生成物のアレリックラダーサイズマーカーを基準として使用しなければならない。一方、塩基を付加されていない元のプライマーを使用する場合は、この元のプライマーから生成されたPCR増幅生成物のアレリックラダーサイズマーカーを基準として使用しなければならない。

【0018】ゲル電気泳動の場合、分子量の大体同じ物質は大体同じ移動度を有する。従って、マーカーの各フ

ラクションと大体同じbp数を有する被分析DNA断片はマーカーの各フラクションと大体同じ様な移動パターン(ラダーパターン)を示す。図2においてMで示されるアレリックラダーサイズマーカーの各ラダーイメージフラクションの塩基対長(bp数)は既知であり、そのフラクション内の多型(例えば、[AATG])の繰返し数も既知である。従って、基準となるアレリックラダーサイズマーカーの所定の繰返し数のラダーフラクション部分と同じ位置に存在する被分析DNA断片のラダーフラクションはマーカーと同じ繰返し数を有することとなる。このようにして被分析DNA断片の多型解析が行われる。

【0019】本発明の多型解析方法を実施するのに使用される蛍光シーケンサ自体は公知のシーケンサを使用することができる。このようなシーケンサとしては例えば、特開平7-98276号公報に記載されるような装置を好適に使用することができる。この装置の泳動板中のゲル電解質層の各泳動レーン上端の凹部に、基準となるアレリックラダーサイズマーカーの蛍光標識PCR増幅生成物と、分析すべきDNA検体の蛍光標識PCR増幅生成物を所定量注入し、前記電解質層に電圧を印加し前記各蛍光標識PCR増幅生成物を泳動させ、前記凹部より所定の距離を隔てた位置で、レーザ光を、泳動してきた増幅生成物に照射し、該生成物から放出された蛍光を蛍光検出手段で受光し、この受光信号をラダーパターンとして出力する。そして、基準となるアレリックラダーサイズマーカーの蛍光標識PCR増幅生成物のラダーパターンと分析すべきDNA検体の蛍光標識PCR増幅生成物のラダーパターンとを比較し、多型の繰返し数の解析を行う。

【0020】

【実施例】以下、実施例により本発明の多型解析方法を具体的に例証する。

実施例1

実験の目的

[AATG]の塩基の連なりからなるTH01多型領域の繰返し数を検査することにより親子鑑定実験を行った。

【0021】ステップ1：DNA検体の抽出

3人の被験者のヒト末梢血リンパ球より、抽出・精製した染色体DNAを用いて以下の操作を行った。

【0022】ステップ2：標的DNA領域の増幅・抽出・精製

TH01多型を含む領域の増幅には、耐熱性酵素Taqポリメラーゼを使用し、PCR法により増幅を行った。PCR増幅を行う際のプライマーは、次のものをサイクロンプラスDNA/RNA合成器で作製して用いた。

プライマー1：

5'-GTGGGCTGAAAAGCTCCCCGATT
AT-3'

プライマー2:

5'-*ATTCAAAGGGTACTCGGGCTCTGG-3'

(プライマー2における*はテキサスレッドからなる蛍光色素を示す。)

このプライマー1と2の濃度が各7ピコモル、染色体DNA量が10~50ng、Taqポリメラーゼが2単位となるようにそれぞれを加え、更に最適濃度のバッファー(緩衝液)を加え、最終容量を50μlとし、PCR増幅を行った。PCRのサイクルは、

解離反応: 温度 94℃, 反応時間 60秒間

対合反応: 温度 58℃, 反応時間 45秒間

伸長反応: 温度 72℃, 反応時間 45秒間

を1サイクル反応として、30サイクル行った。この増幅反応により得られるPCR産物は全長が179~203bpからなる2本鎖DNAであった。プライマー2には蛍光色素が付加されているので、増幅されたPCR生成物は蛍光色素で標識されていることとなる。

【0023】ステップ3: DNA断片の分離及び検出

日立電子エンジニアリング社から市販されているSQ-5500(レーザ光源: ヘリウムネオンレーザ)を使用し、断片の分離路長200mm、5%ロングレンジャーゲル、印加電圧1000ボルト、緩衝液TBEバッファー(0.09モルのトリス、0.09モルのホウ酸および0.002モルのEDTAからなるpH8.0の混合液)の条件により、前記ステップ2で得られた蛍光標識PCR増幅生成物を、基準となるTH01多型領域の蛍光標識アレリックラダーサイズマーカーと共にゲル電気泳動分析した。この検出ラダーパターンを図1に示す。

【0024】ステップ4: プライマーへの塩基付加

前記ステップ2で使用されたプライマー1の5'末端にATの2塩基をベックマンDNAシンセサイザーを用いて付加し、下記の配列を有するプライマーを合成した。
5'-ATGTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT-3'

【0025】ステップ5: 塩基付加プライマーを用いた基準アレリックラダーサイズマーカーの作製

ステップ4で得られた塩基付加プライマーと、ステップ2における蛍光色素が付加されたプライマー2を使用し、基準アレリックラダーサイズマーカーとして使用するべき蛍光標識PCR増幅生成物を、ステップ2で説明したPCR法により作製した。

【0026】ステップ6: 塩基付加プライマーを用いた標的DNA領域の増幅・抽出・精製

ステップ4で得られた塩基付加プライマーと、ステップ2における蛍光色素が付加されたプライマー2を使用し、分析すべき標的DNA領域の蛍光標識PCR増幅生成物を、ステップ2で説明したPCR法により作製した。

【0027】ステップ7: DNA断片の分離及び検出

前記ステップ4と同様にしてDNA断片の分離及び検出を行った。この検出ラダーパターンをステップ4のラダーパターンと共に図1に示す。図1において、ステップ4におけるアレリックラダーマーカーは“M”で示され、ステップ7におけるアレリックラダーマーカーは“Ma”で示されている。図1に示された結果から明らかなように、PCR法で使用されるプライマーに塩基を2個付加することにより、元のプライマーを用いた増幅生成物のラダーパターンとの間に明確な移動差を生じさせることができた。斯くして、単一の蛍光色素でも、同時に2種類の検体を分析することができた。

【0028】

【発明の効果】以上説明したように、本発明によれば、プライマーに塩基を付加することにより、元のプライマーからPCR法により増幅された生成物と塩基付加プライマーからの増幅生成物とに分子量差を付け、電気泳動における移動度に差を生じさせる。これにより、電気泳動のラダーパターンに差が生じ、単一の蛍光色素でも2種類の検体を高い分解能で同時に分析することができ

【0029】また、使用する蛍光色素が1種類のため、励起光源、受光系の構造を簡単にできる。更に、検出する蛍光が1種類のため、物理的なフィルタ又はソフトウェアなどによる蛍光の分離処理が必要ない。また、汎用的な単色のサイズマーカーを使用して、全ての遺伝子座に対して高精度なサイズ決定が可能となる。

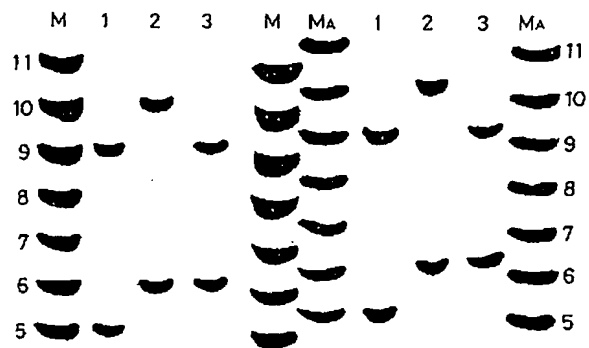
【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1におけるPCR増幅生成物と基準となるアレリックラダーサイズマーカーのゲル電気泳動による移動状態を示すラダーパターン図である。

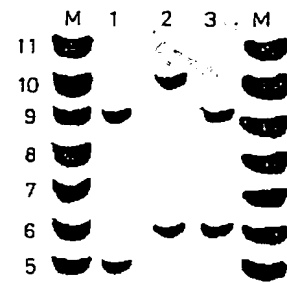
【図2】親子鑑定などに使用される多型解析の一例を示すラダーパターン図である。

【図3】PCR法の原理を説明する模式的工程図である。

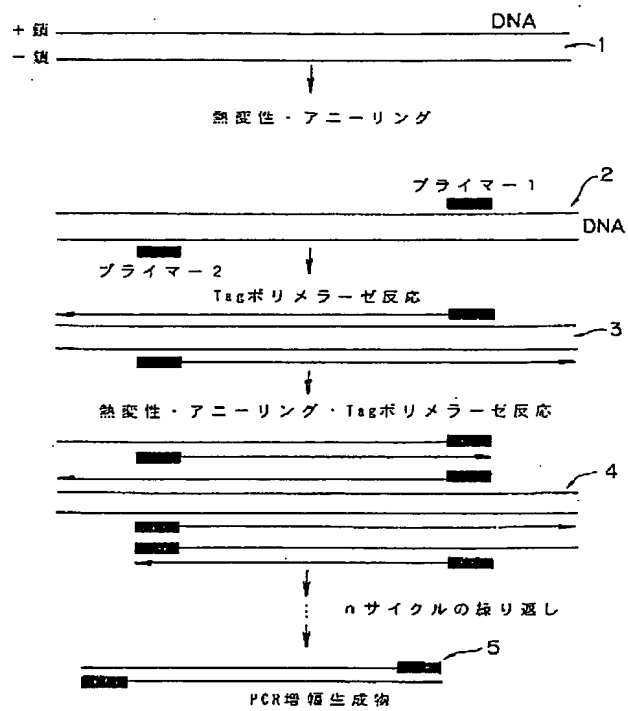
【図1】



【図2】



【図3】



Best Available Copy